

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VARIEDADES-ELITE DE *Coffea arabica* L. ATRAVÉS DE MARCADORES AFLP

RUGGIERO, L.M.C.^{2,3}; COLOMBO, C.¹; MALUF, M.P.² e GUERREIRO FILHO, O.²

¹ IAC/Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica; ² IAC/Centro de café e Plantas Tropicais; ³ CENA/USP – Piracicaba - IAC - AV. Barão de Itapura, 1481, Caixa Postal 28, 13100-970 – Campinas – SP, <ccolombo@iac.br>

RESUMO: Ao longo de 70 anos de pesquisas voltadas para o melhoramento genético do cafeeiro, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) acumulou importante germoplasma desta cultura. Diversos cultivares foram selecionados e vêm sendo cultivados não apenas no Brasil, como também em vários países cafeicultores. No caso da espécie *C. arabica*, uma das dificuldades surgidas com o crescente número de cultivares obtidos está relacionada à correta identificação das linhagens que o compõem, freqüentemente de parentesco muito próximo, o que torna difícil a diferenciação destes através dos descritores botânicos e agrônômicos. Diante desse contexto, a caracterização das principais linhagens dos cultivares Mundo Novo, Acaia, Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Icatu Vermelho, Icatu Amarelo, Icatu Precoce, Bourbon Amarelo, Ouro Verde e Obatã, de *C. arabica*, vem sendo realizada utilizando-se a técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polimorfism). Os fragmentos obtidos foram visualizados em gel de acrilamida 5%, através da marcação dos *primers* com fluorescências específicas e da utilização de seqüenciador automático (ABI 377). Até o momento, 663 fragmentos foram obtidos e analisados em função da presença ou ausência das bandas geradas. Utilizando-se o aplicativo NTSYs, foi calculado um índice de similaridade genética (Jaccard) e a partir dele construído um dendrograma (UPGMA). Os resultados obtidos até o presente momento atestam a grande quantidade de informações geradas por esse tipo de marcador. Todas as linhagens utilizadas no presente estudo foram diferenciadas umas das outras em pelo menos 10% do total de bandas polimórficas utilizadas para as análises. No entanto, as relações de parentesco não são coerentes com as informações sobre a origem genética destas, sugerindo que novos marcadores sejam obtidos.

Palavras-chave:

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ELITE VARIETIES OF *Coffea arabica* L. USING AFLP MARKERS

ABSTRACT: During the past 70 years, the Instituto Agronômico de Campinas (IAC) has been involved with research aiming the genetic improvement of coffee plants. Several cultivars have been developed and are currently cultivated, not only in Brazil, but also in other coffee producer countries. One major difficulty associated with the development of coffee cultivars, specifically those belonging to *Coffea arabica*, is the accurate identification of inbred lines. These inbreds share a high genetic similarity, due to a close ancestral relationship, difficulting their discrimination by traditional botanical descriptors. Therefore, the characterization of inbreds of IAC *C. arabica* commercial cultivars such as Mundo Novo, Acaia, Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Icatu Vermelho, Icatu Amarelo, Icatu Precoce, Bourbon Amarelo, Ouro Verde and Obatã, has been accomplished by the technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). The amplified fragments were visualized in a 5% acrylamide gel by specific fluorescent - labeled primers at an ABI377 Automatic sequencer. A total of 663 fragments were evaluated, considering presence or absence of these in all inbreds tested. The analysis was performed using the software NTSYS, a coefficient of genetic similarity (Jaccard) was determined and used for the construction of a phylogenetic dendrogram (UPGMA). The results obtained until now confirmed the high number of polymorphic markers generated by this type of marker. All inbreds tested were identified by at least 10% of total polymorphic fragments utilized. However, the genetic relationships revealed by them are not in agreement with the parental origin of these cultivars, suggesting that new molecular markers may be found.

Key words:

INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos agrícolas no mundo. O início do seu cultivo deu-se no Iêmen, há cerca de 500 anos, e aproximadamente em 1700 alcançou o sudeste da Ásia. Posteriormente, no início do século XVIII, progênies de uma única planta foram levadas da Indonésia para a Europa e depois para o continente americano (Chevalier e Dagon, 1928; Carvalho, 1946). No final do século XVIII, introduções ocorreram do Iêmen para o Brasil, desta vez sementes das variedades Typica e Bourbon, estabelecendo-se a base genética para obtenção dos principais cultivares plantados tanto no Brasil como em outros países (Krug et al., 1939; Carvalho et al., 1969). Conseqüentemente, a cafeicultura brasileira e mundial é representada basicamente por esses poucos genótipos.

Embora a introdução de variabilidade genética tenha sido realizada a partir da introdução de novos genótipos e até mesmo de outras espécimes de café, principalmente a partir da década de 30, as análises

genéticas sobre a variabilidade genética de cafeeiros cultivados, principalmente *C. arabica*, tem revelado pouca variação, não somente por questões históricas, como já salientado, mas também por ação do próprio melhorista, que acaba favorecendo o aumento de genótipos com grande parentesco. No caso de se realizarem cruzamentos dirigidos, o melhorista normalmente procura cruzar plantas que tenham características agrônômicas complementares e que sejam as mais divergentes possíveis do ponto de vista de parentesco, e isso não é muito fácil de ser identificado quando as plantas são muito parecidas. A distinção entre diferentes variedades deve ser estabelecida através de distâncias mínimas dos caracteres que as diferenciam, normalmente fornecidas por descritores, como tipo de fruto, formato de folha, altura da planta, resistência a enfermidades, cor da flor, etc. A diferenciação de genótipos semelhantes através dos descritores convencionais pode muitas vezes apresentar dificuldades inerentes ao seu número limitado e à interferência do ambiente na expressão destes. Essas dificuldades tendem a aumentar na medida em que ideótipos varietais de uma mesma espécie, com características agrotécnicas precisas, são cada vez mais parecidos. Como resultado, as distâncias mínimas necessárias para se estabelecer uma distinção entre elas são cada vez menores.

Nos últimos anos, os progressos da biologia molecular permitiram o desenvolvimento de algumas técnicas de marcadores moleculares, capazes de indicar com precisão as variações genéticas presentes no DNA de um organismo qualquer. Com relação aos marcadores clássicos, eles têm como vantagens: a) serem marcadores neutros, invariáveis com relação à idade e ao tipo de tecido (Bernatzky e Tanksley 1989); e b) apresentarem número potencial de marcadores polimórficos e número de variação alélica nitidamente maior (Chalmers et al., 1992; Liu e Fournier, 1993), com ampla cobertura do genoma. A crescente necessidade de caracterizar os genomas de cultivares em programas de melhoramento tem resultado em esforços que visam identificar marcadores genéticos em *C. arabica*. O estabelecimento de mapas genéticos baseados em isoenzimas e RFLPs, tanto de DNA total quanto de DNA de cloroplasto, não foi bem sucedido devido ao baixo índice de polimorfismo observado (Lashermes et al., 1996). Até o presente, a técnica de RAPD tem se revelado mais eficiente no estabelecimento de níveis de diversidade genética entre genótipos pertencentes às espécies de *C. arabica* e *C. canephora* (Orozco - Castillo et al., 1994), porém baixa diversidade tem sido encontrada entre cultivares-elite da espécie arábica (Silvestrini, 2000). Baseando-se nessas informações, é possível inferir que para a identificação de polimorfismo em *C. arabica* devem ser utilizadas metodologias que permitam revelar um número maior de *loci*, como é o caso dos AFLPs e microssatélites. A variabilidade genética encontrada em populações de *C. arabica* não é muito grande, o que dificulta a identificação de marcadores genéticos necessários em programas de melhoramento. No entanto, diversos cultivares de *C. arabica* têm sido selecionados até o momento,

através de melhoramento genético clássico, resultante de cruzamentos com outras espécies do gênero *Coffea* (Sondhal e Lauritis, 1992). A introgressão de genes de espécies diplóides como *C. canephora* através da ocorrência de uma taxa natural de alogamia em *C. arabica* é de aproximadamente 10%, o que leva a acreditar que exista certo nível de polimorfismo molecular entre as variedades de *C. arabica* selecionadas no IAC.

O desenvolvimento do princípio de reações de polimerização em cadeia (PCR - Polymerization of Chain Reaction) para as análises de sequência de nucleotídeos (Saiki et al., 1988) e posteriormente os trabalhos de Williams et al. (1990) e Welsh e McClelland (1990) revolucionaram os estudos de marcadores moleculares. Uma das metodologias que utilizam esse princípio é conhecida por AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphic). Esta técnica foi desenvolvida e aplicada por Vos (1995), cuja patente foi depositada pela sociedade Keygene (Wageningen, Holanda). A AFLP combina a especificidade, a resolução e o poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com velocidade e praticidade da amplificação via PCR, gerando grande número de bandas não-aleatórias. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1996), as principais vantagens dos marcadores AFLP são o grande número de fragmentos gerados e resolvidos num único gel, possibilitando que dezenas deles possam ser avaliados; o grande poder de detecção de variabilidade genética, explorando simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição; e a ocorrência ou não de amplificação através da reação de polimerização, não requerendo informação prévia de sequência do DNA. Embora seja mais complexa e exija equipamentos e reagentes mais caros que aqueles utilizados pela RAPD, o grande número de marcadores AFLP potencialmente informativos tem tornado esta técnica bastante atraente para estudos de genética de plantas (Thomas et al., 1995).

Finalmente, o estudo que pretendemos realizar está voltado à introdução dos marcadores AFLP para a caracterização genética de linhagens e/ou cultivares-elite de cafeeiros desenvolvidos pelo IAC, levando-se em conta que a utilização de marcadores moleculares é cada vez mais recorrente e tem se tornado uma ferramenta importante tanto para apoio à continuidade dos programas de melhoramento quanto para garantir a propriedade intelectual do produto final da seleção genética, assegurando aos agricultores ou usuários o acesso à informação necessária à implantação de uma cafeicultura moderna e competitiva.

OBJETIVOS

Gerais

A caracterização molecular de linhagens e cultivares-elite do IAC utilizando a técnica AFLP.

Específicos

- a) Dar subsídios aos melhoristas, no sentido de orientar cruzamentos.
- b) Identificar grupos heteróticos na espécie cultivada - *C. arabica*.
- c) Desenvolver e aplicar os marcadores AFLP em nossos laboratórios, fortes candidatos para estudos futuros de mapeamento e de seleção assistida.
- d) Permitir a correta identificação de linhagens ou cultivares de café, como garantia da propriedade intelectual destes, e assegurar aos agricultores ou usuários o acesso à correta informação sobre o material genético a ser plantado.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material de estudo é representado por cultivares-elite desenvolvidos pelo IAC ao longo do seu programa de melhoramento genético, em ensaios de avaliação final em diferentes regiões do Estado de São Paulo.

Metodologia

Extração de DNA

O DNA total foi extraído a partir de folhas jovens de cinco plantas de cada linhagem estudada, baseado em protocolo utilizado pelo CIMMYT (Laboratory Protocols - CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory), que prevê as etapas a seguir. Um grama de folhas foi pesado e macerado em N₂ líquido, até se obter um pó bem fino; o tecido macerado foi ressuspenso gentilmente em tampão de

extração (0,35 M de Sorbitol, 0,10 M de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de EDTA pH 8,0 e 0,5% [w/v] de bissulfito de sódio) e centrifugado a seguir por 20 minutos a 1.000 g a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. Em seguida, o pellet foi ressuspensionado em 2,5 ml de tampão de extração, acrescido de 3,5 ml de tampão de lise (0,2M de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de EDTA pH 8,0, 2 M de NaCl e 2% de MATAB e 0,7 ml de 10% SDS). A seguir a mistura foi incubada a 65°C por 30 minutos, misturando a solução ocasionalmente. Adicionou-se 1,0 vol de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Inverteu-se o tubo diversas vezes, até que a solução ficasse homogênea. A emulsão foi centrifugada a 4°C (1000g/15 minutos) e a fase aquosa transferida para um novo tubo. Em seguida, o DNA foi precipitado pela adição de 10% vol de acetato de sódio 3 M e 1,0 vol de etanol mantido em geladeira. Após o DNA ter sido precipitado, a mistura foi centrifugada (10.000g/15 minutos) e o pellet ressuspensionado em 1 ml de TE (10mM de Tris-HCl pH 8,0 e 1mM de EDTA pH 8,0). Após dissolução, adicionaram-se 200 µg/ml de RNase e a mistura incubada por 30 minutos a 37°C. Novamente, o DNA foi extraído com 1 vol de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), a emulsão foi misturada até ficar uniforme e centrifugada a 8000g/10 minutos a 4 °C. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o DNA precipitado pela adição de 10% vol de acetato de sódio 3M e de 1 vol de etanol gelado 100%. Após centrifugação (10000g/15 minutos), eliminou-se a fase aquosa e o pellet foi deixado sobre bancada para secar. Posteriormente, o DNA foi suspenso em 200 µl de TE. A qualidade e o rendimento da extração foram estimados em gel de agarose 0,8%.

Obtenção dos marcadores AFLP

A metodologia AFLP utilizada envolveu as seguintes etapas:

- a) *Digestão do DNA genômico com as enzimas EcoRI e MseI.* Foram adicionados num tubo Eppendorf contendo 1,5 ml: tampão 5x (5 µl), DNA (280 ng/ µl-18 µl), Eco RI/MseI (2 µl) H₂O (para completar 25 µl). Para várias amostras foram feitas soluções mãe contendo H₂O + tampão + EcoR I/Mse I. A solução foi incubada a 37 °C durante 4 horas. A inativação das endonucleases foi feita a 70 °C durante 15 minutos e, em seguida, a solução foi mantida no gelo, aguardando a ligação.
- b) *Ligação dos adaptadores.* Adicionaram-se 19 µl do adaptador de ligação e 1 µl de T4 DNA ligase. A solução foi diluída 1/10, homogeneizada e posta no freezer a -20 °C.

c) *Reação de pré-amplificação*. Adicionaram-se 2,5 µl do DNA ligado diluído, 20 µl de *primers* de pré-amplificação, 2,5 µl de tampão PCR 10x e 5 u/µl de Taq polimerase e realizou-se a pré-amplificação (PCR).

d) *Amplificação seletiva AFLP*. Preparou-se uma solução com H₂O, tampão PCR 10X, *primer MseI* (1 µl) dNTP (1 mM), Taq polymerase (5 u/µl), *primer EcoRI* (1µl) marcado, e realizou-se a amplificação em um amplificador térmico automático.

e) *Leitura das bandas através do Aplicativo GENE SCAN e GENOTYPER (Applied Biosystems)*. Após a corrida, os géis foram inicialmente analisados no aplicativo GENE SCAN, que extrai as bandas amplificadas através da análise do gel e fornece um eletroferograma cujas bandas são representadas na forma de picos. Com auxílio do aplicativo GENOTYPER realizaram-se as análises dos picos. A análise comparativa dos fragmentos obtidos para cada genótipo com o padrão de peso molecular presente durante a corrida de eletroforese revelou o tamanho dos fragmentos amplificados, tendo sido considerados para análise apenas aqueles acima de 50 pb.

Primers utilizados

O kit de AFLP é fornecido com 16 *primers*, sendo metade deles para cada uma das duas extremidades obtidas após digestão (*Eco RI* e *Mse I*). No total, 64 diferentes combinações são possíveis de serem realizadas. Destas, 30 foram testadas em duas linhagens (Icatu Vermelho IAC 4045 e Apoatã IAC 2258), em função de estas linhagens terem apresentado bom perfil de amplificação em amplificações de RAPD (Tabela 2). Convencionou-se que, para cada combinação de *primers*, o primeiro deles seria o da extremidade cortada pela enzima *Eco RI* (*primers* estes marcados com as diferentes fluorescências disponíveis, ou seja, verde, amarelo ou azul) e o segundo, da extremidade clivada pela enzima *Mse I*.

Tabela 2 - Relação das 30 combinações de *primers* selecionados

Fluorescência	Combinações de primers selecionados											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Verde	P ₆ P ₁	P ₆ P ₂	P ₆ P ₃	P ₆ P ₄	P ₆ P ₅	P ₆ P ₆	P ₇ P ₁	P ₇ P ₂	P ₇ P ₃	P ₇ P ₄	P ₇ P ₅	P ₇ P ₇
Amarelo	P ₃ P ₃	P ₃ P ₄	P ₄ P ₁	P ₄ P ₂	P ₄ P ₄	P ₄ P ₆	P ₄ P ₇	P ₅ P ₄	P ₅ P ₅	P ₅ P ₇		
Azul	P ₁ P ₄	P ₁ P ₆	P ₁ P ₈	P ₂ P ₁	P ₂ P ₂	P ₂ P ₄	P ₂ P ₅	P ₂ P ₈				

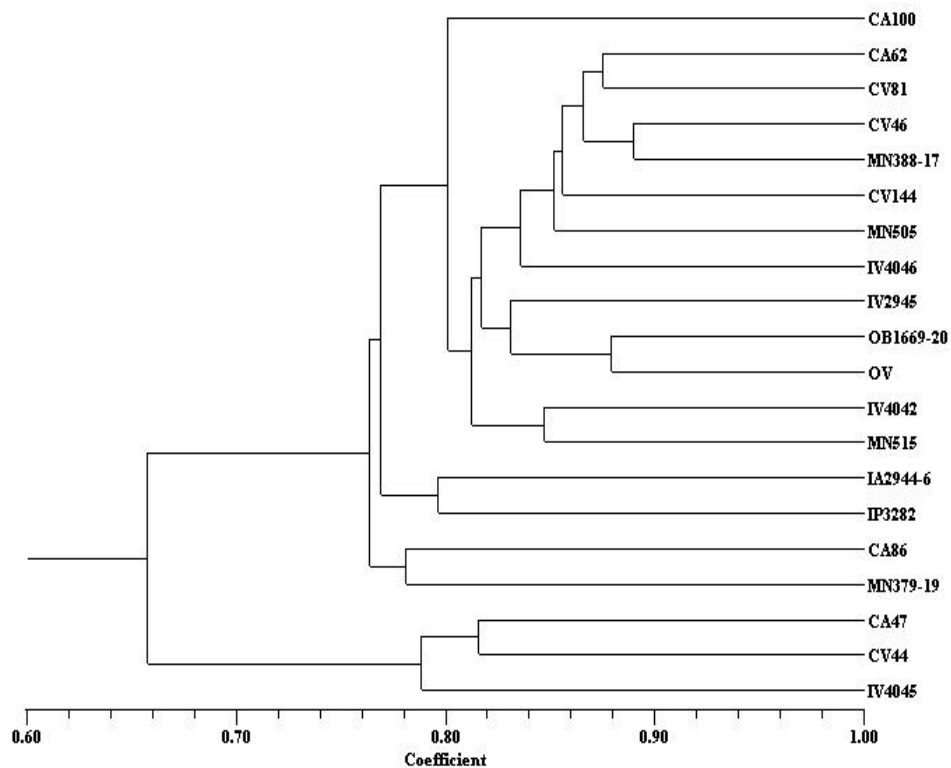
Análise estatística

Apenas bandas consideradas polimórficas foram retidas para análise e anotadas na forma de presença (0) e ausência (1). A partir de uma tabela de dupla entrada (genótipos x bandas) foi calculado o coeficiente de similaridade de Jaccard e, posteriormente, a construção de um dendrograma (UPGMA). Os dados foram analisados pelo programa NTSYS, versão 1.70 (Rohlf, 1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 30 *primers* testados nos dois genótipos previamente escolhidos, apenas os 12 marcados com fluorescência verde foram testados até o presente momento. Destes, os *primers* P6 e P7 apresentaram os melhores resultados em relação a número e qualidade de bandas geradas. Um total de 663 bandas polimórficas foi obtido no conjunto dos genótipos avaliados.

Figura 1 - Dendrograma (UPGMA) para representação de linhagens de café a partir das similaridades genéticas (Jaccard) calculadas em função de 663 bandas AFLP.



A = Acaia, BA = Bourbon Amarelo, CA = Catuaí Amarelo, CV = Catuaí Vermelho, IA = Icatu Amarelo, IP = Icatu Precoce, IV = Icatu Vermelho, MN = Mundo Novo, OB = Obatã e OV = Ouro Verde.

A construção de dendrogramas a partir do polimorfismo dos fragmentos obtidos é uma maneira de interpretar e caracterizar as relações de parentesco entre indivíduos, conforme se verifica na Figura 1. Para interpretação dos resultados, procurou-se considerar o conhecimento disponível das relações de parentesco das linhagens e dos cultivares estudados. Assim, esperava-se que linhagens de um mesmo cultivar estivessem representadas próximas umas das outras nos dendrogramas obtidos, revelando a similaridade genética existente entre elas. No entanto, observou-se que as linhagens estão distribuídas de maneira aleatória nos dendrogramas, não apresentando uma estruturação que permitisse corroborar o surgimento destas linhagens. Por exemplo, as diferentes linhagens do cultivar Catuaí Vermelho encontram-se distantes umas das outras, sendo o coeficiente de similaridade entre elas relativamente baixo. Nem mesmo a introgressão de genes de *C. canephora* em cultivares de *C. arabica* parece interferir na separação dos cultivares.

A primeira evidência que se tem das análises realizadas até o momento é de que a quantidade de fragmentos polimórficos gerados pela técnica AFLP foi suficiente para diferenciar os materiais estudados, indicando serem apropriados para a detecção de polimorfismo entre linhagens aparentadas de *C. arabica*. As duas linhagens geneticamente mais próximas possuem 10% do total de bandas analisadas com polimorfismo. No entanto, a não-capacidade de obtenção de uma diferenciação que concorde com a história do surgimento destes materiais necessita ser esclarecida. Novas combinações de *primers*, assim como outras categorias de marcadores, estão sendo implementadas no sentido de permitir conclusões mais seguras. Entretanto, considerando que também os marcadores RAPD não foram suficientemente capazes de discriminar com clareza estes mesmos genótipos, uma hipótese que gostaríamos de lançar é a de que a base genética da espécie *C. arabica* utilizada nos programas de melhoramento genético do IAC é, além de estreita, formada por uma grande população representada por seus cultivares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNATZKY, R.; TANKSLEY, S.D. 1989. Restriction fragments as molecular markers for germplasm analysis and utilisation. In: Brown A.D.H., Marshall D.R., Franket O.H., Williams J.T. (eds). **The use of plant genetic resources**. Cambridge University Press, p.353-362.
- CARVALHO, A.; KRUG, C.A.; MENDES, J.E.T.; ANTUNES FILHO, H.; MORAES, H.; ALOISI SOBRINHO, J.; MORAES, M.V.; ROCHA, T.R. 1952 Melhoramento do cafeeiro. IV. Café Mundo Novo. *Bragantia*, Campinas, 12:97-129.
- CARVALHO, A. 1945. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie *Arabica*. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café** 21:174-180.

- CHALMERS, K.J.R.; WAUGH, R.; SPRENT, J.I.; SIMMONS, A.J.; POWELL, W. 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliciridi sepium* and *G.maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69:465-472.
- CHEVALIER, A.; AND DAGRON M. 1928. **Recherches historiques sur les débuts de la culture du caféier en Amérique.** Communications et Actes de l'Académie des Sciences Coloniales, Paris.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1996. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2ª. edição. Embrapa. pp 220.
- KRUG, C.A.; MENDES, J.E.T.; CARVALHO, A. 1938. Taxonomia de *Coffea arabica* L. Descrição das variedades e formas encontradas no Estado de São Paulo. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo,** Campinas, (62):1-57.
- LASHERMES, P.; CROS, J.; COMBES, M.C.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; HAMON, S.; CHARRIER, A. 1996. Inheritance and restriction fragment length polymorphism of chloroplast DNA in the genus *Coffea* L. **Theor. Appl. Genet.**, 93: 626 -632.
- LIU, Z.; ET FOURNIER, G.R.; 1993. Comparison of allozyme, RFLP and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theoretical and Applied Genetics*. 87:97-105.
- OROZCO - CASTILLO, C.; CHALMERS, K.J.; WAUGH, R.; POWEL, W. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.**_93: 934- 940.
- ROHLF, F.J. NTSys-pc: **Numerical taxonomy and mutivariate analysis system.** 1992. New York: applied Biostatistics Inc., 237p.
- SAIKI, R.K.; GELFOND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, B.T.; MULLIS K.B.; EALICH, H. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239: 487-491.
- SILVESTRINI, M.; MALUF, M.P.; GUERREIRO-FILHO, O.; e COLOMBO, C. 2000. Caracterização de linhagens comerciais de café através de marcadores moleculares. I SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. Poços de Caldas, 26 a 29 de setembro de 2000, MG. **Resumos Expandidos.** pp. 142-144.

- SONDHAL, M.R.; LAURITIS, J.A. 1992. Coffee. In: Biotechnology of perennial fruit crops. **Biotechnology in agriculture** 8: 401 -420.
- THOMAS, C.M.; VOS, P.; ZABEAU, M.; JONES, D.A.; NORCOTT, K.A.; CHADWICK, B.P. AND JONES, J.D.G. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. **Plant J.** 8:785-794.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research.** 23(21):4407-4414.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Res.** 18: 7213 -7218.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIF, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKY, J.A.; TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. **Nucleic Acid Res.** 18: 6531-6535.